

OPTIMASIFREKUENSIPEMBERIAN VITAMIN C PAD A PAKAN KOMERSIAL UNTUK PENGENDALIAN PENYAKIT KOI HERPES VIRUS (KHV) PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio* Linn.)¹ [Optimization Frequency of Ascorbic Acid in Feed to Control the Koi Herpes Virus (KHV) Disease Infecting Common Carp {*Cyprinus carpio* Linn.}]

Taukhyd², Angela Mariana Lusiastuti^{2^*}, Kusumasari Suryadi³, Rosidah³ dan Gunawan Setiadharma³

²Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor

¹Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran

"e-mail: lusiastuti@yahoo.com

ABSTRACT

The research with objective to understand optimization frequency of supplemented ascorbic acid (microencapsulated vitamin C CFC-90) feeding to control the Koi Herpes Virus (KHV) disease infecting common carp has been done in Fish Disease Laboratory. Fishes were reared in plastic container (80 litres), with density of 20 fish sized 10 gram in average. The treatments were: (A) daily application, (B) three daily application, (C) five daily application, and (D) without vitamin C as a control. Examined fishes were challenged to KHV infection after the 21 days rearing period by cohabitation method for 2 weeks. Observations been done on behaviour, clinical signs and mortality of fishes. The results showed that the highest survival rate was found on the application of vitamin C given every 3 days (50.0%); followed by every day (12.5%), every 5 days (7.5%), and the lowest was found on control group (1.3%). Control techniques in the case of KHV carp populations through the provision of vitamin C immunostimulatory conducted regularly since well before the existence of KHV infection provides the best protective level.

Kata kunci/ key words: Koi herpes virus/KHV, vitamin C, tingkat kelangsungan hidup/survival rate, ikan mas/common carp

PENDAHCIJUAN

Koi Herpesvirus (KHV) merupakan penyakit viral pada ikan mas dan koi (*Cyprinus carpio*) yang sangat menular, menginfeksi semua umur atau ukuran ikan. Penyakit tersebut dapat mengakibatkan mortalitas antara 80-100% dari total populasi ikan, dengan masa inkubasi antara 1-7 hari. Pada umumnya infeksi KHV dipicu oleh penurunan suhu lingkungan sehingga disebut sebagai virus yang menyerang saat dingin. Individu yang bertahan hidup pada saat terjadi wabah umumnya akan menjadi tahan terhadap infeksi berikutnya. Namun ketahanan tersebut tidak menunjukkan adanya transfer kepada keturunannya (*maternal immunity*). Secara klinis dan atau visual, infeksi KHV sering ditunjukkan dengan adanya nekrosis pada organ insang, eksesi mukus, lepuh pada kulit, serta pergerakan renang yang tidak terarah (*nervous movement*) (Taukhyd *et al*, 2005").

Hingga kini belum tersedia teknologi pengendalian penyakit KHV yang memiliki tingkat keberhasilan dan kesesuaian yang tinggi untuk berbagai sistem budidaya ikan mas dan koi. Secara medis, infeksi virus sangat sulit dikendalikan dengan menggunakan obat atau bahan kimia dan strategi

alternatif yang paling prospektif untuk pengendalian penyakit tersebut adalah melalui pendekatan ekologis dan biologis. Pendekatan ekologis antara lain dapat dilakukan dengan mengeksplorasi parameter lingkungan yang dapat memblokir kemampuan multiplikasi dan virulensi virus. Sedangkan pendekatan biologis dapat dilakukan melalui pembekalan dini kekebalan tubuh, baik kekebalan spesifik maupun non-spesifik serta pemanfaatan materi biologis lainnya yang berpotensi menghambat dan merusak kemampuan multiplikasi dan virulensi virus.

Sejumlah materi biologis dan sintetis (*immunostimulants*) telah diketahui memiliki potensi untuk meningkatkan ketahanan tubuh ikan. Vitamin C merupakan salah satu unsur yang berperan penting sebagai koenzim reaksi biokimia dalam tubuh, mencegah kelainan bentuk tulang, mencegah pengaruh negatif akibat gangguan lingkungan atau stres dan meningkatkan ketahanan tubuh (Lim dan Lovell, 1978; Lovell, 1982; Navarre dan Halver, 1989; Deeda, 1991), serta mempercepat proses penyembuhan luka (Jouncey *et al*, 1985; Ikeda, 1991). Pemberian vitamin C hingga dosis tertentu akan meningkatkan kesehatan ikan mulai dari perkembangan telur hingga dewasa, dan apabila

kekurangan akan mengakibatkan penurunan kemampuan sintesa kolagen, sehingga mempengaruhi proses penyembuhan luka (Ikeda, 1991).

Peningkatan sistem pertahanan tubuh, di mana mekanismenya diduga adalah sebagai koenzim modulator melalui aktivasi *cell mediated immunity* (Navarre dan Halver, 1989; Ikeda, 1991 dan Robinson, 1991). Vitamin C juga berperan penting dalam pemeliharaan sistem kekebalan yaitu membantu memelihara fungsi sel fagosit melalui peningkatan kegiatan kemotaktik netrofil dan makrofag serta mobilitas fagosit. Kegiatan tersebut dapat berpengaruh langsung terhadap pembentukan sel-sel fagosit. Penambahan vitamin C jenis CFC-90 (*micro-encapsulated vitamin C*) pada pakan komersial sebanyak 750 mg/kg pakan yang diberikan selama 14 hari berturut-turut pada populasi ikan mas diperoleh rataan sintasan sebesar 82,22% setelah diuji tantang dengan KHV melalui teknik pemaparan (*cohabitation*), sedangkan rataan sintasan pada kelompok kontrol sebesar 27,78% (Taukhid dan Lusiastuti, 2006).

Secara biologis tubuh ikan mas tidak mampu mensintesa vitamin C secara langsung sehingga dibutuhkan sumber vitamin C dari luar untuk kelangsungan metabolismenya. Sedangkan apabila berlebih vitamin C di dalam tubuh ikan akan dibuang melalui sistem ekskresi. Pemberian vitamin C sebagai imunostimulan dalam jumlah yang kurang atau berlebih dapat memberikan efek yang kurang baik dan bahkan dapat bersifat immunosupresif, yang akan mengurangi atau bahkan menghilangkan efektivitasnya. Berdasarkan kajian di atas, vitamin C sebagai unsur imunostimulan harus diberikan tepat dosis dan tepat waktu (frekuensi pemberian) agar benar-benar efektif dan mencapai level proteksi yang diharapkan.

Riset ini bertujuan untuk mengetahui frekuensi pemberian vitamin C pada dosis 750 mg/kg pakan yang memberikan level proteksi optimal bagi upaya pengendalian penyakit KHV pada ikan mas.

BAHATANMETODE

Ikan uji

Populasi ikan mas negatif KHV yang digunakan berasal dari satu *batch* yang diperoleh dari

pembudidaya ikan di sekitar Bogor dengan rata-rata bobot tubuh ± 10 gram/ekor. Kelompok ikan tersebut merupakan hasil pembenihan dari populasi induk ikan yang diketahui belum pernah terinfeksi KHV. Konfirmasi bahwa populasi ikan uji bebas dari infeksi KHV melalui deteksi gen KHV secara laboratorium dengan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) menurut metode yang dikembangkan oleh Gray *et al* (2002). Selain pemeriksaan terhadap patogen target ikan uji juga diperiksa secara mikroskopis dan mikrobiologis terhadap adanya infeksi jenis patogen lainnya seperti parasit (*protozoa*, *trematoda*, *Crustacea*), cendawan dan bakteri.

Populasi ikan mas positif KHV yang digunakan sebagai sumber infeksi diperoleh dari pembudidaya atau pedagang ikan di sekitar Bogor dengan gejala klinis sedang terinfeksi KHV. Kepastian bahwa populasi ikan sumber infeksi tersebut positif terinfeksi KHV didasarkan pada batasan definisi kasus KHV yang dikembangkan oleh Taukhid *et al.* (2005a), serta dikonfirmasi secara laboratorium melalui deteksi gen KHV dengan teknik PCR.

Wadah dan pemeliharaan ikan uji

Seluruh wadah dan perlengkapan pemeliharaan ikan uji sebelum dan selama pelaksanaan riset didesinfeksi dengan menggunakan larutan kalium permanganat (KMNO₄) pada dosis 150 ppm selama 2 jam. Serok, selang air dan perlengkapan lain yang digunakan secara bersamaan selalu didesinfeksi dalam larutan kalium permanganat pada dosis 1000 ppm. Jumlah wadah yang digunakan selama periode perlakuan hingga sesaat sebelum proses uji tantang (pra uji tantang) adalah lima buah bak fiber glass volume 300 liter yang ditutup dengan lembaran fiber glass. Empat buah bak yang digunakan sebagai wadah perlakuan ditempatkan dalam areal yang sama, masing-masing diisi ikan uji dengan kepadatan 100 ekor/bak. Sedangkan satu buah bak lainnya yang digunakan untuk menampung ikan positif KHV ditempatkan pada areal yang terpisah (terisolasi), diisi ikan sebanyak 20 ekor dan selalu dilakukan penggantian apabila terjadi kematian.

Air pemeliharaan dilengkapi dengan aerasi yang diatur secara manual, sehingga diasumsikan

masing-masing wadah memperoleh pasokan oksigen yang relatif sama. Pada masing-masing wadah pemeliharaan selama periode pra uji tantang dilengkapi dengan *water heater* yang diatur pada kisaran suhu 30-32°C serta sebuah termometer maksimum-minimum yang di-re.set/ setiap 24 jam. Penyifonan air pemeliharaan dilakukan 2 kali sehari (pagi dan sore) sebanyak 10-25% dari total volume air.

Pakan yang diberikan selama kegiatan riset adalah pakan komersial (Taisho: FF-999) dengan kadar protein kasar sebesar 38% tanpa indikasi vitamin C. Pemberian pakan dilakukan 3 kali sehari pada pukul 08.00, 12.00 dan 16.00 sebanyak 3% dari total biomassa ikan; sedangkan penyesuaian jumlah pakan dilakukan setiap 10 hari.

Perlakuan

Perlakuan yang diterapkan adalah frekuensi pemberian vitamin C jenis CFC-90 (*microencapsulated vitamin Q*) yang ditambahkan ke dalam pakan komersial pada dosis 750 mg/kg pakan dengan frekuensi pemberian:

- A. Setiap hari
- B. Setiap 3 hari
- C. Setiap 5 hari
- D. Tanpa penambahan vitamin C (sebagai kontrol).

Masing-masing perlakuan diulang 4 kali. Analisis terhadap sintasan ikan uji dilakukan dengan uji F yang akan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan.

Penambahan vitamin C ke dalam pakan dilakukan secara konvensional dengan cara melekatkan vitamin C secara langsung beberapa saat sebelum diberikan kepada ikan uji. Pemberian vitamin C pada masing-masing kelompok dilakukan selama 14 hari.

Uji tantang

Pada minggu ke-IV, seluruh kelompok perlakuan diinfeksi KHV secara buatan dengan teknik kohabitasi, dan berlangsung selama 14 hari. Uji tantang dilakukan dalam wadah pemeliharaan berupa bak plastik volume 80 liter yang diisi air sebanyak 60 liter, dengan ikan uji sebanyak 20 ekor (3 liter/ekor) bersama ikan positif KHV sebagai sumber infeksi sebanyak 10 ekor/wadah. Ikan uji dibedakan dengan ikan sumber infeksi dengan cara

memotong salah satu sirip dada. Ikan sumber infeksi yang mati selama proses uji tantang diganti dengan individu baru, sehingga proporsi ikan sumber infeksi selama berlangsungnya proses uji tantang adalah 1 ekor/6 liter air.

Pemberian pakan bervitamin C dan prosedur penyifonan air pada masing-masing kelompok perlakuan tetap dilanjutkan selama berlangsungnya proses uji tantang. Selama pengujian suhu air pemeliharaan dipertahankan pada kisaran 24-27°C. Pengaturan suhu pada kisaran tersebut dilakukan dengan cara memasukkan es (terbungkus plastik) pada saat suhu air berada pada posisi 27°C, dan umumnya terjadi pada hari panas antara pukul 11.00- 15.00.

Pengamatan

Pengamatan dilakukan terhadap tingkah laku, gejala klinis dan mortalitas ikan uji dilakukan setiap hari hingga akhir percobaan. Penghitungan *differential leucocyte* dan aktivitas fagositik dilakukan pada pra dan pasca uji tantang menurut metoda yang dikembangkan oleh Anderson dan Siwicki (1995). Analisa beberapa parameter kualitas air yang meliputi pH, oksigen terlarut, ammonia, nitrit, dan bahan organik total dilakukan secara berkala setiap minggu sedangkan suhu air (termometer maksimum-minimum) dilakukan setiap hari.

Deteksi gen KHV dengan teknik PCR dilakukan menurut metoda yang dikembangkan oleh Gray *et al.* (2002) terhadap populasi ikan uji pada (1) sebelum proses aklimatisasi, (2) sesaat sebelum proses uji tantang, (3) serta pada hari ke-7 dan 14 saat uji tantang. Sedangkan pada populasi ikan sumber infeksi, deteksi gen KHV dilakukan (1) sebelum didatangkan ke lokasi riset, dan (2) sesaat sebelum proses uji tantang. Pengambilan sampel untuk masing-masing kelompok dilakukan dengan teknik sampling selektif (*non-probability sampling*) yang didasarkan pada tingkah laku dan gejala klinis, dengan ukuran sampel 4-10 ekor. Analisis sampel dengan teknik PCR dilakukan secara pooling terhadap sampel yang berasal dari kelompok perlakuan atau *batch* yang sama.

HASIL

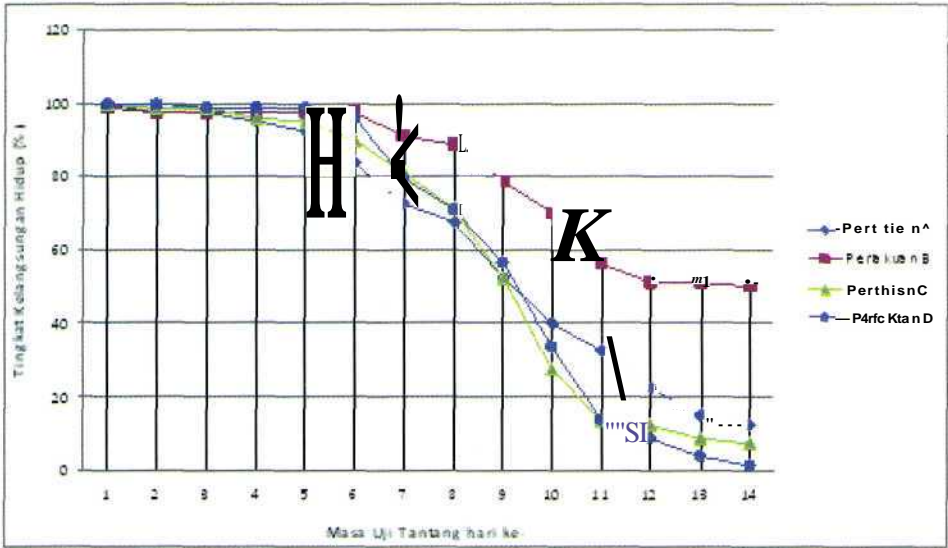
Hasil pengamatan secara klinis serta deteksi gen



Gambar 1. Profil produk *polymerase chain reaction* (PCR) dari sampel ikan uji negatif *koi herpesvirus* (KHV) pada gel agarose (Keterangan: lane 1 marker 100 bp DNA ladder; lane 2-6, KHV negatif; lane 7 kontrol positif)



Gambar 2. Profil produk *polymerase chain reaction* (PCR) dari sampel ikan uji positif *koi herpesvirus* (KHV) pada gel agarose (Keterangan: lane 1 marker 100 bp DNA ladder; lane 6, lane 9-11 KHV positif; lane 12 kontrol negatif; lane 13 kontrol positif)

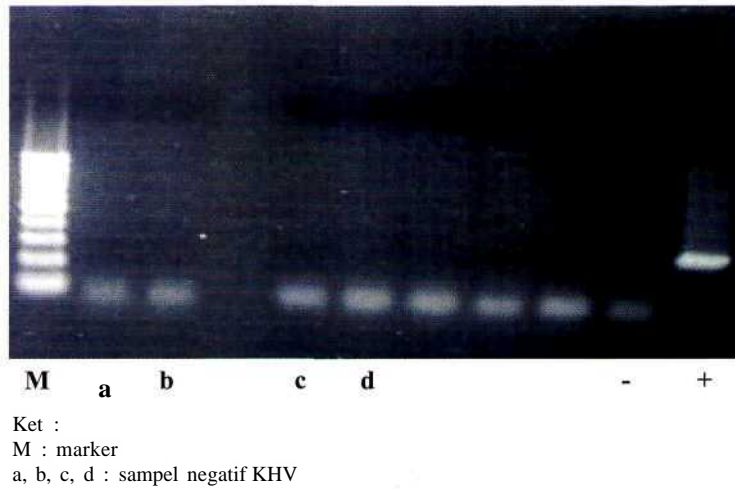


Gambar 3. Grafik rata-rata tingkat kelangsungan hidup ikan mas yang diuji tantang dengan KHV selama 14 hari setelah 21 hari masa pemberian vitamin C

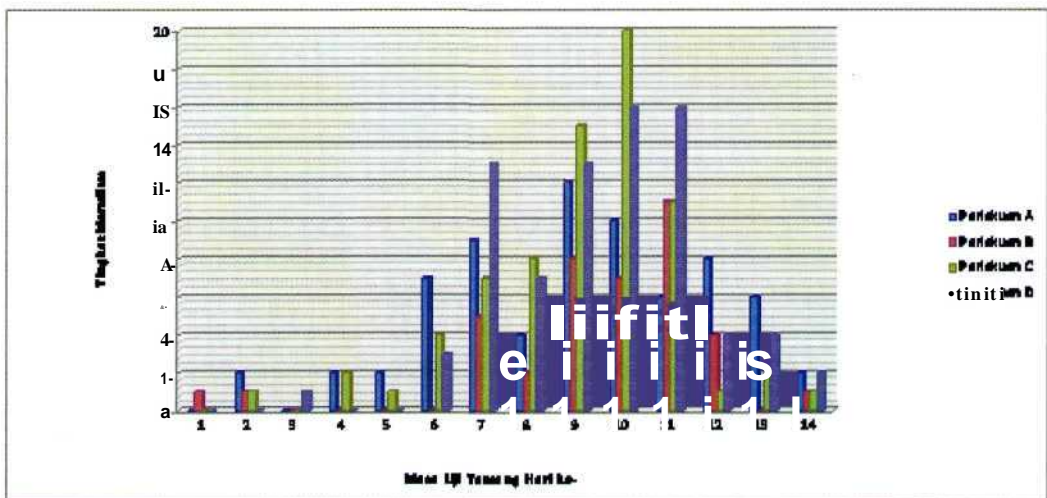
KHV dengan teknik PCR terhadap populasi ikan uji negatif KHV diperoleh hasil negatif seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1; sedangkan populasi ikan positif KHV sebagai sumber infeksi diperoleh hasil positif seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2. Pengamatan secara mikroskopis dan mikrobiologis terhadap populasi ikan uji negatif KHV diketahui bahwa populasi ikan tersebut dalam status sehat dan bebas dari infeksi kelompok patogen parasitik (*eksternal protozoa, monogenetik trematoda* dan *Crustacea*), mikotik (*Saprolegniaceae*) dan bakterial (*Aeromonas hydrophila* dan *Flexibacter columnaris*).

Ikan uji yang telah diberi perlakuan pemberian vitamin C selama 21 hari kemudian diuji tantang dengan KHV. Perlakuan uji tantang dilakukan selama 14 hari, hal ini dikarenakan KHV memiliki masa inkubasi berkisar antara 1-14 hari. Hasil pengamatan terhadap tingkat kelangsungan hidup memperlihatkan adanya tingkat perbedaan pada setiap perlakuan.

Tingkat kelangsungan hidup terendah ditunjukkan oleh ikan kelompok perlakuan D yaitu perlakuan yang tidak diberi vitamin C. Tingkat kelangsungan hidup ikan perlakuan D yaitu sebesar 1,268%. Sedangkan tingkat kelangsungan hidup



Gambar 4. Hasil pengamatan PCR minggu pertama ujiantang.



Gambar 5. Grafik tingkat mortalitas ikan mas yang diuji tantang dengan KHV selama 21 hari setelah 14 hari masa pemberian vitamin C.

tertinggi ditunjukkan pada ikan kelompok perlakuan B (dosis vit C yang diberikan setiap 3 hari) yaitu sebesar 50%. Rata-rata tingkat kelangsungan hidup ikan mas dari masing-masing perlakuan dan kontrol ditunjukkan pada Gambar 3.

Pengamatan memperlihatkan bahwa terjadi angka kematian cukup tinggi pada hari ke-7 yaitu 9 ekor pada perlakuan A, 5 ekor pada perlakuan B, 7 ekor pada perlakuan C dan 13 ekor pada perlakuan D. Pada hari tersebut diperkirakan tingkat virulensi KHV telah meningkat. Pengamatan selanjutnya pada hari ke 8-12 tingkat kelangsungan hidup pada semua perlakuan

menurun, yang dapat diakibatkan oleh tingkat virulensi KHV telah berada pada titik optimum; data'dukung alasan tersebut ini ditunjukkan oleh hasil pengamatan PCR yang menunjukkan hasil positif pada semua perlakuan (Gambar 4). Tingkat virulensi yang tinggi ini diakibatkan oleh penurunan suhu lingkungan hingga mencapai angka 24°C.

Pengujian statistik menggunakan analisis sidik ragam memperlihatkan perbedaan frekuensi pemberian vitamin C memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan mas yang diinfeksi KHV Hasil uji Duncan memperlihatkan bahwa

Tabel 1 . Rata-rata kelangsungan hidup ikan mas

Perlakuan Pemberian Vitamin C	Kelangsungan Hidup (%)	Notasi statistik
Setiap Hari (A)	12,5	a
Tiga Hari Sekali (B)	50	b
Lima Hari Sekali (C)	7,5	a
Tidak diberi vitamin C (D)	1,268	a

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama memberikan pengaruh yang tidak berbeda menurut uji Duncan pada taraf 5%

Tabel 2. Rata-rata persentase nilai diferensial leukosit (limfosit, monosit, dan netrofil) darah ikan uji dan kontrol.

Sampling/Perlakuan	Limfosit (%)	Monosit (%)	Netrofil (%)
Pertama (Aklimatisasi)			
Perlakuan A	53	5	32
Perlakuan B	83	1	16
Perlakuan C	67	2	31
Perlakuan D (Kontrol)	69	1	30
Kedua (Pemberian vitamin C)			
Perlakuan A	80	5	15
Perlakuan B	88	2	10
Perlakuan C	83	0	17
Perlakuan D (Kontrol)	71	1	28
Ketiga (Uji Tantang 1)			
Perlakuan A	75	0	25
Perlakuan B	60	0	40
Perlakuan C	75	12	13
Perlakuan D (Kontrol)	98	0	2
Keempat (Uji Tantang 2)			
Perlakuan A	79	0	21
Perlakuan B	76	3	21
Perlakuan C	93	0	7
Perlakuan D (Kontrol)	94	0	6

Tabel 3. Rata-ratanilai indeks fagositik (%) sel fagosit fungsional darah ikan uji yang diberi vitamin C dan kontrol dari 100% sel darah putih. (A = setiap hari, B = setiap 3 hari, C = setiap 5 hari, dan D = kontrol).

Sampling	Perlakuan			
	A	B	C	D
Pertama (Sebelum Perlakuan)	17	19	15	18
Kedua (Setelah Perlakuan)	81	78	50	20
Ketiga (Pada Uji Tantang)	50	63	29	16

rata-rata tingkat kelangsungan hidup ikan mas yang diberi perlakuan pemberian vitamin C dengan frekuensi lima hari sekali (perlakuan C) tidak berbeda dengan perlakuan tanpa pemberian vitamin C (perlakuan D). Sedangkan rata-rata kelangsungan hidup ikan mas yang diberi perlakuan pemberian vitamin C dengan frekuensi setiap hari dan perlakuan pemberian vitamin C (Perlakuan A) dengan frekuensi tiga hari sekali (Perlakuan B) berbeda dengan perlakuan tanpa pemberian vitamin C (Perlakuan D) (Tabel 1).

Indeks fagositik untuk mengetahui respon sel-

sel fagosit terhadap adanya antigen seperti bakteri *Staphylococcus aureus*. Sampling dilakukan duakali, pertama pada saat aklimatisasi, kedua pada akhir masa pemberian perlakuan vitamin C.

Dari hasil pengamatan indeks fagositosis dalam darah ikan uji, terlihat bahwa sel fagosit fungsional pada kelompok yang diberi perlakuan vitamin C rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Adanya perbedaan tersebut merupakan indikator bahwa ikan uji kelompok perlakuan memiliki kemampuan pertahanan non-spesifik yang lebih baik dibandingkan

dengan kelompok kontrol. Rata-rata nilai indeks fagositosis dari masing-masing perlakuan disajikan pada Tabel 3.

PEMBAHASAN

Secara umum, penurunan tingkat kelangsungan hidup pada ikan uji disebabkan oleh adanya penurunan tingkat kekebalan tubuh ikan yang dipicu oleh adanya infeksi KHV dan penurunan suhu lingkungan. Di daerah beriklim sedang, infeksi patogen pada saat musim dingin menyebabkan infeksi kronik karena respon kekebalan tubuh lumpuh sehingga tubuh tidak mampu melawan infeksi.

Tingkat virulensi tertinggi terjadi pada hari ke sebelas, dengan indikasi tingkat mortalitas yang tinggi dengan rata-rata sebesar 50% dan dapat menyebabkan tingkat kelangsungan hidup menurun hingga 20%. Pada periode 11-14 hari, nampak penurunan rata-rata tingkat kelangsungan hidup ikan mas yang diberi vitamin C relatif rendah ditandai dengan penurunan tingkat kematian dan kondisi ikan yang mulai terlihat stabil.

Tingkat kelangsungan hidup perlakuan B termasuk tinggi, menurut Perelberg dkk. dalam Suharni (2006) yang mengemukakan serangan penyakit KHV dapat menyebabkan kematian 80-100%. Tingginya tingkat kelangsungan hidup pada perlakuan B diduga akibat pemberian vitamin C dengan frekuensi tiga hari sekali sudah mampu merangsang kekebalan tubuh ikan. Irianto (2005) menyatakan bahwa pemberian imunostimulan harus dilakukan secara tepat baik dosis maupun frekuensinya agar dapat memberikan pengaruh positif terhadap pembentukan kekebalan tubuh.

Berdasarkan pengamatan, pada insang ikan yang terinfeksi KHV ditemukan berbagai parasit antara lain, *Argulus* sp., *Dactylogyrus* sp., serta *Ichthyophthirius multifiliis*, kemudian terdapat pula infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Flexibacter columnaris*. Infeksi kedua bakteri tersebut terlihat dari adanya perubahan fisik ikan uji, antara lain bercak putih agak kekuningan pada insang, pendarahan pada bagian ship serta lepasnya sisik dari tubuh ikan. Adanya infeksi sekunder pada ikan uji telah dikemukakan oleh Tauhid dkk. (2006) bahwa pada ikan yang terserang KHV akan ditemukan infeksi sekunder yang disebabkan oleh

parasit, jamur maupun bakteri.

Berkaitan dengan hasil riset yang diperoleh, menurut Irianto (2005) pemberian imunostimulan yang terlalu rendah atau terlalu tinggi akan memberikan pengaruh yang kurang baik terhadap pembentukan kekebalan tubuh. Pemberian vitamin C yang terlalu sering atau melebihi kadar rangsang ginjal akan dapat memacu ginjal untuk melakukan ekskresi secara terus menerus. Adanya peningkatan aktivitas ekskresi dapat menyebabkan lemahnya kondisi kesehatan ikan, sehingga pada akhirnya kondisi pertahanan tubuh ikan terhadap patogen menjadi lemah.

Verlhac dan Gabaudan (1997) mengemukakan bahwa pemberian vitamin C harus dilakukan secara terus menerus (kontinu) dalam rentang waktu yang tidak terlalu jauh, sehingga mampu memicu kekebalan non spesifik.

Penurunan tingkat kelangsungan hidup pada perlakuan B yang tidak terlalu tajam, diduga karena zat aktif pada vitamin C mampu diserap secara optimal oleh ikan uji. Penyerapan vitamin C secara optimal tersebut diduga mampu meningkatkan kekebalan tubuh ikan uji dalam melawan infeksi KHV. Pemberian vitamin C tidak bersifat semakin sering semakin baik tetapi lebih bersifat frekuensi dan dosis yang tepat dan cukup akan semakin baik dalam pembentukan kekebalan non spesifik.

Pada akhir penelitian, kondisi ikan yang mendapat perlakuan vitamin C mulai terlihat lebih stabil. Fenomena ini diduga karena tubuh ikan uji yang diberi perlakuan vitamin C mulai meningkatkan respon kekebalan tubuh sehingga mampu melawan infeksi KHV. Pengamatan terhadap rata-rata proporsi tiga jenis sel leukosit (limfosit, monosit dan netrofil, mendukung fenomena di atas dengan adanya sel limfosit yang lebih tinggi.

Diferensial leukosit merupakan salah satu parameter untuk mengetahui status kesehatan dan kemampuan pertahanan tubuh terhadap adanya infeksi jasad patogen. Nilai rata-rata proporsi tiga jenis sel leukosit (limfosit, monosit dan netrofil) yang diamati dari ikan uji selama empat kali sampling disajikan pada Tabel 2. Sampling pertama dilakukan sebelum perlakuan pemberian vitamin C, sampling kedua dilakukan setelah perlakuan pemberian vitamin C, sampling ketiga

dilakukan pada minggu pertama ujiantang, sampling keempat dilakukan pada saat minggu kedua ujiantang dan sampling kelima dilakukan pada saat minggu ketiga ujiantang.

Pada sampling pertama terlihat bahwa persentase jumlah sel limfosit, monosit dan netrofil untuk semua kelompok perlakuan menunjukkan nilai yang bervariasi. Pada sampling pertama, kondisi sel darah ikan belum dipengaruhi oleh apapun dan merupakan jumlah awal persentase sel darah putih ikan uji. Pada sampling kedua terlihat persentase jumlah sel limfosit pada perlakuan A, B dan C yang meningkat sedangkan persentase jumlah sel monosit dan netrofil menunjukkan hal yang sebaliknya, yaitu relatif tinggi pada sampling pertama. Adanya peningkatan jumlah limfosit di dalam sel darah putih diperkirakan karena adanya masukan vitamin C yang merangsang pembentukan kekebalan non spesifik ikan uji. Peningkatan jumlah limfosit pada kelompok perlakuan diduga sebagai akibat dari pemberian vitamin C, hal ini sesuai dengan hipotesis Raa *et al.* (1992).

Pada sampling ketiga jumlah limfosit menurun sedangkan monosit dan netrofil meningkat. Hasil sampling ketiga ini menunjukkan aktivitas perlawanan dari sel-sel darah putih terhadap adanya infeksi KHV. Aktivitas perlawanan dari sel-sel darah putih menyebabkan turunnya jumlah sel limfosit karena komponen ini berfungsi menyediakan zat kebal untuk pertahanan tubuh (Dellman dan Brown, 1989). Peningkatan persentase jumlah netrofil pada kelompok perlakuan menunjukkan aktivitas netrofil dalam mencapai dan menyerang antigen yang masuk ke dalam tubuh. Selain itu peningkatan jumlah netrofil mengindikasikan adanya peningkatan kegiatan pengumpulan makrofag di tempat terjadinya infeksi, sehingga makrofag akan lebih mudah untuk menghancurkan partikel asing. Makrofag mampu memiliki aktivitas fagositosis yang tahan lama, mengolah antigen dalam persiapan untuk tanggap kebal dan memberi kontribusi langsung pada perbaikan jaringan yang rusak dengan membuang jaringan yang sudah mati, ataupun yang sedang mengalami proses kematian dan yang telah rusak. Adanya peningkatan persentase jumlah netrofil diduga akibat distimulasi oleh mated imunostimulan, sehingga aktivitas produksi oleh

organ pembentuk sel tersebut kian meningkat.

Pada keseluruhan sampling persentase monosit didapatkan relatif rendah, hal ini dimungkinkan karena adanya respon keseimbangan hematologi terhadap peningkatan proporsi sel leukosit jenis lainnya, yaitu limfosit dan netrofil. Sel monosit diduga berpera sebagai sistem pertahanan kedua dimana sistem ini berlangsung lambat dan lama tetapi mampu melakukan fagositosis berulang-ulang (Tizard, 1988).

Menurut Verlhac dan Gabaudan (1997) adanya peningkatan intensitas infeksi oleh patogen tertentu akan memicu peningkatan kebutuhan akan sel-sel darah putih terutama sel-sel fagosit. Peningkatan kebutuhan tersebut mengakibatkan adanya pengurangan jumlah sel agen penyedia zat kebal tubuh yaitu limfosit. Hal ini sesuai dengan hasil pengamatan persentase diferensial leukosit di mana pada saat ujiantang minggu pertama nilai limfosit menurun dibandingkan dengan masa yang lain.

Fagositosis merupakan salah satu respon seluler organisme terhadap kehadiran partikel asing atau antigen. Persentase sel darah putih yang memfagosit pada saat sampling pertama tidak sebanyak pada sampling kedua. Peningkatan aktivitas fagositosis yang cukup signifikan pada sampling kedua diduga sebagai akibat dari pemberian vitamin C karena imunostimulan dapat memacu proses opsonin sel makrofag dan leukosit terhadap partikel asing sebagaimana disampaikan oleh Raa *et al.* (1992).

Pada sampling ketiga aktivitas fagositosis telah mengalami penurunan, yang diduga karena sel-sel fagosit belum terdiferensiasi sempurna pada saat sampling. Alasan belum terdiferensiasinya sel-sel fagosit tersebut diindikasikan karena sel tersebut telah digunakan dalam pertahanan tubuh pada saat ikan diantang KHV.

KESIMPULAN DAN SARAN

Teknik pengendalian kasus KHV pada populasi ikan mas melalui pemberian imunostimulan vitamin C secara berkala yang dilakukan sejak dini sebelum adanya infeksi KHV memberikan level protektif yang cukup baik.

Pemberian vitamin C melalui pakan sebesar 750 mg/kg pakan setiap 3 hari sekali memberikan level

proteksi yang lebih baik dibandingkan dengan pemberian vitamin C setiap hari atau 5 hari sekali yang dicerminkan oleh lebih tingginya sintasan setelah diuji tantang dengan KHV melalui teknik pemaparan. Secara berurutan sintasan pada populasi ikan yang diberi vitamin C setiap 3 hari sekali adalah sebesar 50%, sedangkan pada populasi yang diberi vitamin C setiap hari sebesar 12,5%, setiap 5 hari sebesar 7,5%, dan tanpa pemberian vitamin C sebesar 1,3%.

Masih perlu dilakukan evaluasi lanjut untuk mengoptimalkan hasil yang diperoleh dalam bentuk aplikasi di lapangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Riset ini dibiayai oleh DIPA Tahun Anggaran 2007 Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Saudara Mikdarullah, Edy Farid, Bambang Priadi dan Ahmad Wahyudi yang telah membantu pelaksanaan kegiatan ini baik di lapangan maupun di laboratorium.

DAPFTAR PUSTAKA

- Anderson DP and AK Siwicki. 1995.** Duration of Protection Against *Aeromonas hydrophila*. *Pubmed* 73, 159-165.
- Dellman HD and EM Brown. 1989.** *Buku Teks Histologi Veteriner*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Gray WL, L Mullis, SE LaPatra, JM Groff and A Goodwin. 2002.** Detection of Koi Herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *Journal of Fish Disease* 25, 171-178.
- Ikeda S. 1991.** The crucial role of vitamin C in fish farming. *Bulletin Gold Coin Aquaculture*, 13(12), 1-13.
- Irianto A. 2005.** *Patologi Ikan Teleostei*. Gadjah Mada University Press.
- Lim C dan RT Lovell. 1978.** Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal Nutrition* 108, 1137-1148.
- Lovell TR. 1982.** Elevated levels of vitamin C increase disease resistance in channel catfish. *Aquaculture Research* 29(1), 17-21.
- Jouncey K, AK Soliman and RJ Roberts. 1985.** Ascorbic acid requirements in relation to wound healing in the cultured tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Fish Management* 16, 139-149.
- Navarre O and JE Halver. 1989.** Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture* 79, 207-221.
- Raa J, G Roerstad, R Engstad and B Robertsen. 1992.** The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: M Shariff, RP Subasinghe and JR Arthur (Eds.). *Diseases in Asian Aquaculture 1. Proceeding of the First Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*, 26-29 November 1990, Bali, Indonesia, 39-50. Manila, Philippines, Fish Health Section, Asian Fisheries Society.
- Robinson H. 1991.** Deficiency sign and dietary requirement. *Bulletin Gold Coin Aquaculture* 13(12/91), 16-22.
- Suharni I. 2006.** Efektivitas Simplus Sambiloto dalam Upaya Pengendalian Penyakit Koi Herpesvirus (KHV) pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L). *Skripsi Universitas Pajajaran Fakultas Pertanian Jurusan Perikanan*. Jatinangor.
- Taukhdid, A Sunarto, I Koesharyani, H Supriyadi dan L Gardenia. 2005a.** Strategi pengendalian penyakit Koi Herpes Virus (KHV) pada ikan mas dan koi. *Serial Bunga Rampai: Strategi Pengelolaan dan Pengendalian Penyakit KHV, Suatu Upaya Pemecahan dalam Pembudidayaan Ikan Air Tawar*, 41-60. Pusat Riset Perikanan Budidaya, Badan Riset Kelautan dan Perikanan, Departemen Kelautan dan Perikanan.
- Taukhdid, T Sumiati, dan I Koesharyani. 2005b.** Pengaruh suhu air dan total bahan organik terlarut terhadap patogenisitas Koi Herpes Virus pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Serial Bunga Rampai: Strategi Pengelolaan dan Pengendalian Penyakit KHV, Suatu Upaya Pemecahan dalam Pembudidayaan Ikan Air Tawar*, 83-94. Pusat Riset Perikanan Budidaya, Badan Riset Kelautan dan Perikanan, Departemen Kelautan dan Perikanan.
- Taukhdid dan AM Lusastuti. 2009.** Efektivitas Penambahan Vitamin C (Ascorbic Acid) pada Pakan Komersial untuk Pengendalian Penyakit Koi Herpes Virus (KHV) pada Ikan Mas, *Cyprinus carpio* (in press).
- Tizard IR. 1988.** *An Introduction to Veterinary Immunology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Verlhac V and Gabaudan J. 1997.** *The Effect of Vitamin C on Fish Health*. Switzerland: Roche Vitamins (Brochura No. 51002).